Maisons-Alfort, le 4 décembre 2013

LE DIRECTEUR GENERAL

AVIS

de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à la demande de renouvellement d'homologation de la préparation bactérienne pour luzerne RHIZOSARB LUZERNE LONGUE DUREE, à base de *Sinorhizobium meliloti*, de la société NATURATECH

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) a notamment pour mission l'évaluation des dossiers de matières fertilisantes et supports de culture.
Les avis formulés par l'Agence comprennent :

- *l'évaluation des risques sanitaires que l'utilisation de ces produits peut présenter pour l'homme, l'animal ou l'environnement ;*
- *l'évaluation de leur efficacité sur les végétaux ainsi que celle de leurs autres bénéfices éventuels ;*
- *une synthèse de ces évaluations assortie de recommandations portant notamment sur leurs conditions d'emploi.*

PRÉSENTATION DE LA DEMANDE

L'Agence a accusé réception d'une demande de renouvellement d'homologation au titre des matières fertilisantes de l'inoculum bactérien RHIZOSARB LUZERNE LONGUE DUREE de la société NATURATECH, pour laquelle, conformément à l'article R.255-1-1 du Code rural et de la pêche maritime, l'avis de l'Anses est requis.

Cette demande s'accompagne d'une demande de transfert (n° 2012-0584) de la société J&E SOZIO-DESCOLLONGES à la société NATURATECH et d'une demande de changement de nom (n° 2012-0596) de « INOPLUS LUZERNE LONGUE DUREE » en « RHIZOSARB LUZERNE LONGUE DUREE » (traitement administratif).

Le produit RHIZOSARB LUZERNE LONGUE DUREE bénéficie de l'homologation n° 8310209 pour des usages en pulvérisation sur semences de luzerne à raison de 200 g pour 20 kg de graines (soit un hectare). Selon les termes de l'autorisation en vigueur, cette matière fertilisante est de la classe « Préparation bactérienne de *Rhizobium meliloti* » et du type « Inoculum de microorganismes ».

Les éléments de suivi post-homologation requis étaient les suivants, conformément à la décision d'homologation datée du 23 février 2009 :

Compléments requis	Délai accordé	Réponse	Commentaires de l'Anses
Résultats des analyses de contrôle réalisées sur chaque lot avant commercialisation	6 mois avant l'échéance de l'autorisation	5 lots fabriqués depuis février 2009 (un par an). Résultats du contrôle bactériologique (numérotation et contamination) de ces 5 lots.	Les résultats révèlent une richesse en *Rhizobium meliloti* supérieure aux exigences de l'homologation pour l'ensemble des lots produits, ainsi qu'une absence de contaminants. Le dossier de demande de renouvellement d'homologation a été communiqué ultérieurement au délai réglementaire accordé.

Le présent avis porte sur la préparation bactérienne RHIZOSARB LUZERNE LONGUE DUREE obtenue à partir d'un inoculant biologique à base de *Sinorhizobium meliloti*, souche référence MSDJ0848 (RCR2011), fixé sur un support de tourbe neutralisée par du carbonate de calcium. Cette souche a été isolée dans un sol australien et, en France, tous les inoculums pour luzerne sont fabriqués à partir de cette souche. Cette préparation bactérienne est destinée à la fixation symbiotique de l'azote de l'air par nodulation de la luzerne par la bactérie.

Cet avis est fondé sur l'évaluation par l'Agence du dossier déposé à l'Anses pour cette matière fertilisante, conformément aux exigences du Code rural et de la pêche maritime, de l'arrêté du 21 décembre 1998 et du guide pour l'homologation des Matières Fertilisantes et Supports de Culture (document cerfa 50644#01) et sous réserve de l'utilisation du produit dans le respect des bonnes pratiques agricoles (BPA).

SYNTHÈSE DE L'ÉVALUATION

Les données prises en compte sont celles qui ont été jugées valides par l'Anses. L'avis présente une synthèse des éléments scientifiques essentiels qui conduisent aux recommandations émises par l'Agence et n'a pas pour objet de retracer de façon exhaustive les travaux d'évaluation menés par l'Agence.

Après évaluation de la demande, réalisée par la Direction des produits réglementés avec l'accord d'un groupe d'experts du Comité d'experts spécialisé "Matières Fertilisantes et Supports de Culture", l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail émet l'avis suivant.

CONSIDÉRANT L'IDENTITÉ DE LA PRÉPARATION BACTÉRIENNE

Les caractéristiques garanties pour la préparation bactérienne RHIZOSARB LUZERNE LONGUE DUREE sont les suivantes (sur produit brut) :

Caractéristiques	Valeurs garanties selon la décision d'autorisation de mise sur le marché en vigueur	Valeurs garanties selon la déclaration du pétitionnaire
Matière Sèche	-	63,2%
Nom de la souche	-	Souche *de Sinorhizobium meliloti* référence MSDJ0848 (RCR2011)
Nombre de germes	$2{,}5.10^5$ par mg	$> 5.10^{10}$ par sachet de 200 g

La préparation bactérienne RHIZOSARB LUZERNE LONGUE DUREE se présente sous forme de poudre (sachet de 200 g) et est proposée pour une utilisation en enrobage de semences de luzerne. La poudre doit être mélangée avec 0,5 à 0,75 L d'eau avant l'enrobage des semences.

Usage et conditions d'emploi demandés dans le cadre du renouvellement d'homologation (formulaire cerfa n° 11385 du 23 octobre 2012) :

Culture	Dose par apport (en g d'inoculum.ha^{-1})	Nombre de germes (par ha)	Nombre d'apports par an	Epoque d'apport
Luzerne	200	minimum 5.10^{10}	1	Semis

La dose maximale d'apport prise en compte pour l'évaluation de l'innocuité de la préparation bactérienne est de 200 g par hectare et par an.

CONSIDÉRANT LE MODE DE FABRICATION DE LA PRÉPARATION BACTÉRIENNE ET LA QUALITÉ DE LA PRODUCTION

Caractérisation de la préparation bactérienne et procédé de fabrication

Les spécifications de la préparation bactérienne RHIZOSARB LUZERNE LONGUE DUREE telles que décrites sur le formulaire cerfa 11385 (arrêté du 21/12/98, annexe I) et la fiche d'information sont conformes aux exigences réglementaires.

La préparation bactérienne est obtenue par injection d'une culture de *Sinorhizobium meliloti* dans un sachet de tourbe stérilisée par ionisation. Chaque lot de commercialisation correspond à un sachet de 200 g de produit.

Le système de management de la qualité de la fabrication est décrit de manière satisfaisante. La pureté, la richesse en colonies ainsi que les propriétés de nodulation et de fixation d'azote de la souche de *Sinorhizobium meliloti* MSDJ0848 (RCR2011) sont vérifiées avant chaque campagne de fabrication par le Laboratoire de Microbiologie des Sols de l'INRA de Dijon.

Par ailleurs, chaque lot commercialisé est contrôlé conformément à la décision d'homologation. La vérification des inoculums avant commercialisation porte sur le poids, l'humidité, le pH, la pureté microbiologique (absence de contaminants décelables) et la richesse en *Sinorhizobium meliloti*. Le pétitionnaire précise que les conditions de qualité requises pour qu'un lot soit commercialisable sont d'être fabriqué avec la souche MSDJ0848, avoir une richesse en *Sinorhizobium meliloti* revivifiables au moins égale à $0{,}5.10^{11}$ par dose de un hectare, et d'être exempt de contaminants décelables.

Les attestations croisées de fourniture et d'approvisionnement sont présentées de manière exhaustive pour ce qui concerne les sources de matières premières indiquées dans le dossier technique pour lesquelles ces documents sont requis. Toute autre provenance correspondrait à un changement de composition et nécessiterait une évaluation complémentaire.

La souche *Sinorhizobium meliloti* MSDJ0848 n'est pas manipulée génétiquement, elle est totalement séquencée.

Le support de l'inoculum bactérien est une tourbe brune d'origine allemande. Sa fiche de données de sécurité indique qu'elle est soumise, pour sa mise sur le marché, à l'application de la norme NF U 44-551 Supports de culture.

Aussi, les matières premières, ainsi que le procédé de fabrication, ne présentent pas de danger physico-chimique particulier.

Constance de composition de la préparation bactérienne

L'homogénéité et l'invariance relatives à la richesse en germes de la préparation bactérienne sont considérées comme établies. Tous les lots analysés présentent une richesse en *Sinorhizobium meliloti* supérieure aux exigences de l'homologation (5.10^{10} ufc par sachet).

Aucune donnée de stabilité n'est disponible. Le demandeur précise que tout sachet ouvert doit être utilisé dans les 24 heures.

La durée de stockage de deux ans proposée par le demandeur avant utilisation de la préparation bactérienne est considérée comme acceptable dans les conditions de conservation prescrites sur l'étiquetage.

La technologie d'obtention de la préparation bactérienne et son conditionnement permettent une constance de composition satisfaisante.

Méthodes d'échantillonnage et d'analyse

La méthode d'échantillonnage utilisée dans le cadre du dossier technique pour constituer les échantillons soumis à l'analyse n'est pas décrite mais ne présente pas d'enjeu important dans le cas des cultures microbiennes.

L'analyse de caractérisation physico-chimique et microbiologique de l'inoculum bactérien a été effectuée par un laboratoire accrédité sur le programme 108.

Les analyses relatives aux contrôles de la souche bactérienne et des inoculums ont été réalisées par le Pôle de Microbiologie Environnementale et risque Sanitaire de l'INRA de Dijon.

La souche *Sinorhizobium meliloti* MSDJ0848 (RCR2011) est identifiée par la mise en œuvre d'un profil de restriction de son ADN[1] génomique. La méthode est publiée (Hartmann *et al.*, 1998. FEMS Microbiology Ecology 25, 107-116) et utilise l'enzyme de restriction EcoRI. Cependant, aucun rapport d'analyse n'a été communiqué à l'appui de cette caractérisation de la souche. Un rapport complet (protocole, ensemble des résultats, discussion/comparaison et conclusion) est donc nécessaire pour valider la caractérisation de la souche.

Il est rappelé que, aux écarts admissibles près, la conformité de chaque unité de commercialisation du produit aux teneurs garanties sur l'étiquette est requise, et que ces écarts admissibles ne peuvent pas être exploités de manière systématique.

CONSIDÉRANT LES INFORMATIONS RELATIVES À L'INNOCUITÉ DE LA PRÉPARATION BACTÉRIENNE

Matières premières et procédé de fabrication

L'espèce *Sinorhizobium meliloti* n'est pas pathogène pour l'homme ou l'animal. Elle n'est pas inscrite sur la liste à l'annexe III de la directive 2000/54/CE du 18 septembre 2000 concernant la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents biologiques au travail.

Selon un rapport de l'OCDE[2] consacré à la sécurité l'utilisation des microorganismes en tant que biofertilisants[3], de rares cas d'allergie induite par la mise en présence de grande quantité de *Rhizobium* ont été signalés.

La tourbe, support de l'inoculum bactérien, stérilisée par un traitement ionisant, ne représente pas de danger particulier pour l'homme, l'animal et l'environnement.

Etude toxicologique de la préparation bactérienne

Les teneurs en éléments traces métalliques (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Se, Zn) permettent de respecter les critères d'innocuité pour l'homologation des matières fertilisantes dans les conditions d'emploi préconisées.

Par ailleurs, les données microbiologiques disponibles montrent que la préparation bactérienne respecte les critères en vigueur pour l'homologation.

Aucun essai de toxicologie n'a été communiqué. Cependant, la souche contenue dans la préparation bactérienne RHIZOSARB LUZERNE LONGUE DUREE est utilisée depuis plusieurs décennies en France, sans qu'aucun effet délétère chez l'homme ou l'animal, n'ait été rapporté. De même, les autres composants de la préparation ne sont pas de nature à engendrer un risque pour l'homme ou l'animal.

Au sens du Règlement (CE) n° 1272/2008[4], aucune classification toxicologique n'est requise pour la préparation bactérienne. Néanmoins, s'agissant d'une matière fertilisante à base de microorganismes, la phrase de précaution « Contient *Sinorhizobium meliloti*. Les microorganismes peuvent provoquer des réactions de sensibilisation » doit être mentionnée sur l'étiquette.

Par ailleurs, un masque anti-aérosol (de type EN149 FFP3 ou équivalent), des gants et un vêtement de protection appropriés devront être portés pendant toutes les phases du traitement des semences.

[1] ADN = Acide DésoxyriboNucléique
[2] OCDE = Organisation de Coopération et de Développement
[3] OCDE, 1995. Question relatives à la sécurité en biotechnologie - Passage à l'échelle supérieure des micro-organismes utilisés comme biofertilisants. OCDE Editions, 28-38.
[4] Règlement (CE) n° 1272/2008 = Règlement du Parlement Européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges.

Résidus et sécurité du consommateur

Compte tenu de la nature de la matière fertilisante et de l'usage revendiqué, il n'est pas attendu de risque pour le consommateur.

Devenir dans l'environnement et écotoxicité de la préparation bactérienne

La classification environnementale proposée pour le produit RHIZOSARB LUZERNE LONGUE DUREE est « non classé » au sens du Règlement (CE) n° 1272/2008.

Sur la base de la littérature scientifique existante, la multiplication de *Sinorhizobium meliloti* dans les sols agricoles français ne peut être exclue. Son occurrence naturelle n'est pas renseignée et aucune quantification dans les sols agricoles n'a été communiquée. Sa persistance dans les sols, notamment alcalins, ne peut être écartée. De ce fait, il convient de connaître les conditions environnementales favorables à la croissance de *Sinorhizobium meliloti* pour une meilleure appréhension de son devenir dans l'environnement (persistance et mobilité notamment).

Par ailleurs, des informations additionnelles de l'impact de cette souche sur la communauté microbienne des sols devront être communiquées.

CONSIDÉRANT LES INFORMATIONS RELATIVES À L'EFFICACITÉ DE LA PRÉPARATION BACTÉRIENNE

Caractéristiques biologiques de la préparation bactérienne

Effet revendiqué

L'effet de la préparation bactérienne RHIZOSARB LUZERNE LONGUE DUREE concerne la fixation symbiotique de l'azote de l'air par nodulation de la luzerne par la bactérie (formulaire cerfa n° 11385 du 23 octobre 2012).

Eléments relatifs à l'efficacité intrinsèque et au mode d'action des Rhizobium

Le mode d'action des bactéries est bien établi et repose sur l'existence effective d'une symbiose entre les bactéries du genre *Rhizobium* et les Fabacées, dont fait partie la luzerne.

Cette symbiose est permise grâce à la colonisation du système racinaire de la luzerne par la bactérie *Sinorhizobium meliloti* et la formation de nodosités, véritables organes d'échanges métaboliques entre les bactéries et les plantes. Les bactéries fixent et réduisent l'azote atmosphérique en ammonium, directement assimilable par les plantes hôtes. En échange, les Fabacées leur procurent un apport en substrats carbonés issus de la photosynthèse.

Autre élément d'appréciation des bénéfices

La fixation symbiotique de l'azote de l'air permet des apports en engrais azotés chimiques limités.

Essais d'efficacité

Dans le cadre de la demande de renouvellement de l'homologation, le pétitionnaire ne présente pas de nouvelle expérimentation à l'appui de sa revendication. Toutefois, l'efficacité de *Rhizobium meliloti* pour la fixation de l'azote atmosphérique par la luzerne est avérée et reconnue.

Conclusions sur le mode d'emploi de la préparation bactérienne

Le mode d'emploi affiché sur l'étiquetage est suffisant pour permettre une bonne utilisation de la préparation bactérienne.

Une mention complémentaire précisera que le produit RHIZOSARB LUZERNE LONGUE DUREE ne doit pas être mélangé avec des préparations phytosanitaires.

Revendication et dénomination de classe et de type retenues

La revendication présentée par le pétitionnaire relative à la fixation de l'azote atmosphérique est considérée comme soutenue.

Une nouvelle dénomination de classe et de type est proposée : « Préparation bactérienne pour enrobage de semences de luzerne » - « Inoculum de *Sinorhizobium meliloti* ».

CONCLUSIONS

En se fondant sur les données soumises par le pétitionnaire et évaluées dans le cadre des présentes demandes, ainsi que sur l'ensemble des éléments dont elle a eu connaissance, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail estime que :

A. La constance de composition de la préparation bactérienne RHIZOSARB LUZERNE LONGUE DUREE est convenablement établie.

La caractérisation de la préparation bactérienne devra être complétée par la fourniture du rapport d'analyse permettant de justifier la caractérisation du microorganisme au niveau de la souche.

L'élément de caractérisation retenu pour le marquage obligatoire est le dénombrement des germes de l'inoculum. En outre, le genre, l'espèce et la souche du microorganisme, ainsi que la date limite d'utilisation optimale de la préparation devront être précisés sur l'étiquette.

B. L'innocuité de la préparation bactérienne RHIZOSARB LUZERNE LONGUE DUREE pour l'usage demandé est considérée comme conforme aux exigences réglementaires.

Classification de la préparation bactérienne, phrases de risque et conseils de prudence

La préparation bactérienne est « non classé » au sens du Règlement (CE) n° 1272/2008.

Précautions d'emploi

La mention « Contient *Sinorhizobium meliloti*. Les microorganismes peuvent provoquer des réactions de sensibilisation » doit être affichée sur l'étiquette.

Le port d'un masque anti-aérosol (de type EN149 FFP3 ou équivalent), de gants et vêtements de protection appropriés est obligatoire pour l'utilisateur pendant toutes les phases du traitement de semences.

Une mention complémentaire précisera que le produit RHIZOSARB LUZERNE LONGUE DUREE ne doit pas être mélangé avec des préparations phytosanitaires.

C. L'efficacité du produit RHIZOSARB LUZERNE LONGUE DUREE est avérée et reconnue.

La nouvelle dénomination de classe et de type proposée est : « Préparation bactérienne pour enrobage de semences de luzerne » - « Inoculum de *Sinorhizobium meliloti* ».

Usage et conditions d'emploi retenus (en l'état actuel de l'évaluation)

Culture	Dose par apport* (en g d'inoculum.ha^{-1})	Nombre de germes (par ha)	Epoque et mode d'apport
Luzerne	200	minimum 5.10^{10} ufc**	Inoculation des semences (enrobage) avant le semis

* un sachet dose de 200 g pour 20 kg de semences, soit 1 ha
** unités formant colonie

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail émet un avis **favorable** à la mise sur le marché de la préparation bactérienne RHIZOSARB LUZERNE LONGUE DUREE et propose un renouvellement d'homologation.

Données post-autorisation

Les compléments d'information suivants devront être apportés au plus tard 6 mois avant l'échéance de l'autorisation de mise sur le marché, sauf indications contraires précisées ci-dessous :

Type	Compléments post-homologation requis
Analyses	Effectuer au moins tous les six mois, sur des échantillons représentatifs de la matière fertilisante telle qu'elle est mise sur le marché et selon les méthodes prévues par le programme COFRAC 108 ou spécifiées ci-après, des analyses portant au moins sur : - les éléments figurant sur l'étiquetage (dénombrement des germes) ; - les éléments traces métalliques As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Se, Zn ; - les microorganismes totaux, Entérocoques, *Escherichia coli, Clostridium perfringens, Salmonella, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes*, Nématodes, Levures et moisissures, *Aspergillus, Pythium* (méthodes prévues par le guide pour l'homologation). **Dans un délai de 2 ans**, fournir le rapport d'analyse complet (protocole, ensemble des résultats, discussion/comparaison et conclusion) permettant de justifier la caractérisation, au niveau de la souche, du microorganisme composant la préparation bactérienne. Les analyses doivent avoir été effectuées par un laboratoire accrédité par le COFRAC sur le programme 108 ou par un organisme équivalent (norme NF ISO 17025). Les méthodes d'analyse doivent être en priorité celles du programme 108 du COFRAC. L'emploi de toute autre méthode doit être justifié et il convient d'utiliser en priorité les méthodes normalisées ou standardisées. Le cas échéant, fournir la méthode utilisée, sa justification ainsi que les éléments nécessaires à sa validation. Dans tous les cas, les références des méthodes employées doivent être précisées. Il conviendrait que le responsable de la mise sur le marché conserve à 4°C pendant les 12 mois suivant la mise sur le marché un échantillon représentatif de chacun des lots, en vue d'éventuelles analyses complémentaires rendues nécessaires par une information tardive sur les matières premières ou un éventuel problème constaté par les utilisateurs du produit.
Toxicologie	**Dans un délai de 2 ans**, fournir une synthèse bibliographique actualisée (depuis la publication du rapport OCDE, Question relatives à la sécurité en biotechnologie - Passage à l'échelle supérieure des micro-organismes utilisés comme biofertilisants, 1995) relative à l'impact potentiel du *Sinorhizobium meliloti* sur la santé humaine ou, à défaut de l'ensemble des *Rhizobium*. Cette synthèse devra être accompagnée d'une analyse critique de la bibliographie communiquée.
Environnement Ecotoxicologie	**Dans un délai de 2 ans**, - fournir des éléments permettant de renseigner les conditions environnementales favorables à la croissance de *Sinorhizobium meliloti* afin de mieux appréhender son devenir dans l'environnement (persistance et mobilité notamment) ; - fournir des informations relatives à l'impact de *Sinorhizobium meliloti* sur la communauté microbienne des sols.

Marc MORTUREUX

Mots-clés : RHIZOSARB LUZERNE LONGUE DUREE - *Sinorhizobium meliloti* souche référence MSDJ0848 (RCR2011) - tourbe - enrobage de semences - luzerne - FRES - FCHS